

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 66–72

Vergleichende Untersuchungen zur Anreicherung von Proteinen im gepoolten Lumballiquor¹⁾

*Zur Methodik der Proteinelektrophorese auf Celluloseacetatfolie im Liquor cerebrospinalis,
I. Mitteilung*

Von T. O. Kleine, Maria Stroh und J. Stroh

Aus dem klinisch-chemischen Laboratorium (Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine) der Universitäts-Nervenklinik (Direktor: Prof. Dr. H. Jacob) Marburg/Lahn

(Eingegangen am 30. August/30. November 1973)

Herrn Prof. Dr. Dr. V. Klingmüller zum 65. Geburtstag zugeeignet

Vergleichende Konzentrationsversuche von humanem Sammelliquor werden mittels Vakuum-Ultrafiltration in Kollodiumhülsen (A) und Gefriertrocknung (B) durchgeführt.

Die beiden Methoden zeigen unterschiedliche Ausbeuten:

Gesamtprotein (Biuretmethode) 96% (A), 88% (B), saures α_1 -Glycoprotein 98% (A), 89% (B), Albumin 90% (A), 78% (B), Gesamt-Immunglobuline 72% (A), 61% (B), IgG 98% (A), 85% (B), IgA 81% (A), 74% (B) und IgM 47% (A), 39% (B), gemessen mittels umgekehrter einfacher radialer Immundiffusion und einfacher radialer Immundiffusion. Bei nephelometrischen Antigen-Antikörpermessungen werden z. T. größere Verluste dieser Proteine besonders für Immunglobuline und saures α_1 -Glycoprotein gefunden. Dagegen lassen sich nach Entfernung der Zellen des Liquors mittels Membranfiltration keinerlei Proteinverluste feststellen. Der unterschiedliche Verlust verschiedener Proteine bei der Einengung wird auf Denaturierung bzw. Aggregatbildung von Immunglobulinen zurückgeführt neben Filtration bzw. Adsorption niedermolekularer Proteine. Diese Veränderungen in der Proteinzusammensetzung des konzentrierten Liquors dürften zu erheblichen Fehlern im Pherogramm führen.

Comparison of two procedures to concentrate proteins of collected liquor cerebrospinalis

Studies on the protein electrophoresis of liquor cerebrospinalis with cellulose acetate membranes, I.

Human liquor cerebrospinalis was concentrated by 2 different procedures:

(a) ultrafiltration under vacuum through collodion bags and (B) lyophilization.

Total protein yields: 96% (A) and 88% (B).

Applying inverse single radial immunodiffusion techniques and single radial immunodiffusion techniques the yield for acid α_1 -glycoprotein shows: 98% (A), 89% (B), for albumin 90% (A), 78% (B), for total immunoglobulins 72% (A), 61% (B), for IgG 98% (A), 85% (B), for IgA 81% (A), 74% (B), for IgM 47% (A), 39% (B).

Turbidimetric analysis of the antigen-antibody complex frequently gives lower yields of proteins especially after concentrating the immunoglobulins and the acid α_1 -glycoprotein of human liquor cerebrospinalis. However, there is no loss of liquor proteins at all after removing the cells by filtration. Denaturation and/or aggregation of immunoglobulins as well as filtration and/or adsorption of low molecular proteins probably occurs during the concentration procedure causing a considerable loss of some proteins. These changes of the protein composition of the concentrated liquor cerebrospinalis must cause considerable errors in the pherogram.

Infolge des 100 bis 200fach niedrigeren Proteingehaltes läßt sich die für Serumweiße ausgearbeitete Methodik der Celluloseacetatelektrophorese (vgl. 1–3) im Liquor cerebrospinalis erst nach dessen Konzentrierung anwenden. Deshalb sind zur Anreicherung der Liquorproteine verschiedenartige Verfahren ausgearbeitet worden, von denen hier die wichtigsten genannt seien:

1. Ultrafiltration gegen Vakuum durch proteindichte Kollodiumhülsen (4–18);
2. Ultrafiltration mit Stickstoff-Überdruck (19–28) bzw. mittels Zentrifugation (10) durch eiweißdichte Filter;
3. Konzentrationsdialyse gegen trockene Polymere: Dextran (29–33), Ficoll (5), Aquacides (5), Carbowax 20 M (5), Sephadex G-200 (5, 34) oder gelartige Polymere: Polyvinylpyrrolidon (5, 35),

Kollidon (8, 36), Polyacrylamid-Hydrogel, Gummi arabicum (8, 37);

4. Aceton-Fällung (38–40);

5. Gefriertrocknung (23, 27, 41, 42) bzw. Vakuum-trocknung (43).

Da jedoch wenige vergleichende Angaben über Ausbeute und Qualität dieser Methoden bekannt sind (vgl. 4, 5, 8, 10, 25, 27, 28, 34, 38), insbesondere über die bei den einzelnen Verfahren möglicherweise auftretende Denaturierung von Liquorproteinen, haben wir in einer ersten Versuchsreihe vier verschiedene Konzentrationsverfahren zur Anreicherung von Proteinen eines verdünnten Humanserums bekannter Zusammensetzung geprüft (44).

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen im Lesser-Loewe-Colloquium in Mannheim am 6. Juni 1973.

Dabei zeigten Vakuum-Ultrafiltration in Kollodiumhülsen und Gefriertrocknung Protein-Ausbeuten über 80%, während bei Ultrafiltration mittels Zentrifugation durch proteindichte Filter bzw. bei Konzentrationsdialyse gegen Polyäthylenglycol Verluste einzelner Proteine von mehr als 30% gefunden wurden.

In der vorliegenden Arbeit wird mit den beiden bewährten Konzentrierungsmethoden (s. o.) die Anreicherung von Proteinen im gepoolten menschlichen Lumballiquor untersucht. Dabei war es erforderlich, geeignete immunologische Methoden zur spezifisch-quantitativen Messung von Proteinen im Liquor cerebrospinalis auszuarbeiten.

Methodik

Entfernung der Zellen des Liquor cerebrospinalis

Zur Entfernung der Zellen werden 350 ml gepoolter menschlicher Lumballiquor (0,249 g Protein/l) bei 25° C membranfiltriert (SM Filter 11605, Porengröße 0,6 µm) in einer Apparatur (SM 16315) der Sartorius-Membran-Filter-Werke, Göttingen.

Konzentrierung von Liquor cerebrospinalis

Jeweils 100 ml zellfreier Liquor werden nach folgenden Methoden konzentriert (vgl. Schema 1):

Vakuum-Ultrafiltration

in proteindichten Kollodiumhülsen (SM 13200, Durchlässigkeit MG < 20000) erfolgt nach 60 min Wässern der Hülsen in bidest. Wasser in einer Apparatur (SM 16314) der Sartorius-Werke, Göttingen, gegen einen durch Wasserstrahlpumpe erzeugten Unterdruck bei 4° C. Zur Einengung von 100 ml Liquor auf 3 ml werden 16 h benötigt. Im Filtrat kann mit der Biuret-Methode (s. u.) kein Protein nachgewiesen werden.

Gefriertrocknung

der gefrorenen 100 ml-Liquorprobe wird in einem Rundkolben bei 25° C für 8 h an einer WKF-Anlage (Gesellschaft für Elektrophysikalischen Apparatebau, Brandau bei Darmstadt) durchgeführt. Aufnahmen der Probe in 3,5 ml bidest. Wasser.

Methoden zur Messung von Proteinen

Messen des Gesamtproteins

im Liquor cerebrospinalis erfolgt im Eppendorf-Mikroliter-system: Füllen des Proteins in 0,5 ml Probe mit 0,5 ml eiskalter 0,612 mol/l Trichloressigsäure, Lösen des abzentrifugierten Niederschlags in 1 ml Biuret-Reagenz (vgl. 44a), Ablesen der Extinktion bei 546 nm ($d = 2$ cm) nach 30 min gegen Leerwert (1 ml Biuretlösung). Als Standard dient Hyland-Kontrollserum. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Messen von Proteinen mittels umgekehrter einfacher radialer Immundiffusion

Präalbumin, saures α_1 -Glycoprotein und die Summe IgG, IgA und IgM werden im Liquor cerebrospinalis in Anlehnung an Groc (45) in Agar, zu 10 g/l suspendiert in 0,1 mol/l Triäthanolamin-Puffer pH 7,4, mittels spezifischen Antiseren wie folgt gemessen: 3 g Agarose¹ werden in 80 ml bidest. Wasser im kochenden Wasserbad suspendiert, beim Abkühlen auf 50° C mit 20 ml 1,5 mol/l Triäthanolaminpuffer pH 7,4 gemischt und Thioacid (0,1 g/l) zugesetzt. Je 8 ml auf 50° C gebrachter Liquor cerebrospinalis werden mit 4 ml obiger Lösung mittels Vibrationsmischers gut gemischt und in Plastikpetrischalen (Durchmesser 8 cm) in genau waagerechter Lage gegossen. In den erstarrten Agar werden 12 Löcher mit einem Durchmesser von 3 mm im Abstand von 15 mm

gestanzt und mit 5 µl folgenden Antiserums beschickt (2 Platten zu je 4 Bestimmungen): anti-Präalbumin vom Kaninchen¹) unverdünnt, anti-saures- α_1 -Glycoprotein vom Kaninchen¹) unverdünnt, anti-IgG, A, M von der Ziege¹) 1:1 verdünnt mit 0,15 mol/l NaCl.

Nach 48 h Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur wird entweder nach 24 h Waschen mit 0,15 mol/l NaCl und bidest. Wasser mit Nigrosinlösung, zu 1 g/l gelöst in 0,333 mol/l Essigsäure, 8 h gefärbt (vgl. 45) oder nach 24 h Waschen mit 0,15 mol/l NaCl in 0,07 mol/l Phosphatpuffer pH 7,2 mit wäbr. Tannin (40 g/l, DAB 6) etwa 15–30 min kontrastiert. Das Ausmessen des Gesamtdurchmessers (Präzipitat + Stanzloch) erfolgt mittels Schablone. Auf linearem Millimeterpapier wird das Quadrat dieses Durchmessers als Funktion der Konzentration (g/l) aufgetragen. Eichkurven werden aus 4 Verdünnungen eines standardisierten Humanserums¹) erhalten. In den 3 linearen Eichkurven liegt der Variationskoeffizient VK zwischen 1 und 6%, worin auch der Plattenfehler enthalten ist. Lediglich bei Präalbumin-Konzentrationen von kleiner 2 mg/l steigt VK auf Werte bis zu 10% an. Die zu messenden Proben werden nach Bestimmung des Gesamtproteingehaltes (s. oben) mit 0,15 mol/l NaCl auf die jeweiligen Eichkurven-Konzentrationen verdünnt.

Messen von Proteinen mittels einfacher radialer Immundiffusion

Albumin, Immunglobuline IgG, IgA und IgM werden in Liquorproben nach der Methode von Mancini et al (46) in sog. Partigen-Platten¹) gemessen unter Verwendung von Standardseren¹) zur Eichung. Es werden Zwei- bis Dreifach-Bestimmungen durchgeführt. Mittlerer Variationskoeffizient < 10%, weitere Einzelheiten vgl. oben und 46, 47.

Nephelometrisches Messen von Proteinen mittels ihres Antigen-Antikörper-Komplexes

Die bei der Vereinigung von Albumin, saurem α_1 -Glycoprotein, Summe IgG, A, M und IgG mit den spezifischen Antiseren auftretende Trübung wird im Photometer Eppendorf bei 366 nm in einer Thermomikroküvette der Schichtdicke $d = 1$ cm bei 25° C in Liquorproben in folgenden Ansätzen serienmäßig in Doppelbestimmungen gemessen (vgl. Kleine (48)):

Albumin (Gesamt volumen 320 µl):

250 µl 0,1 mol/l Triäthanolamin-Puffer pH 7,4 in 0,14 mol/l NaCl

50 µl Antiserum vom Kaninchen¹) unverdünnt

20 µl Probe

Maximale Ausbildung der Trübung ist bereits nach 60 min Inkubation erreicht (Abb. 1). Die Eichkurve verläuft linear

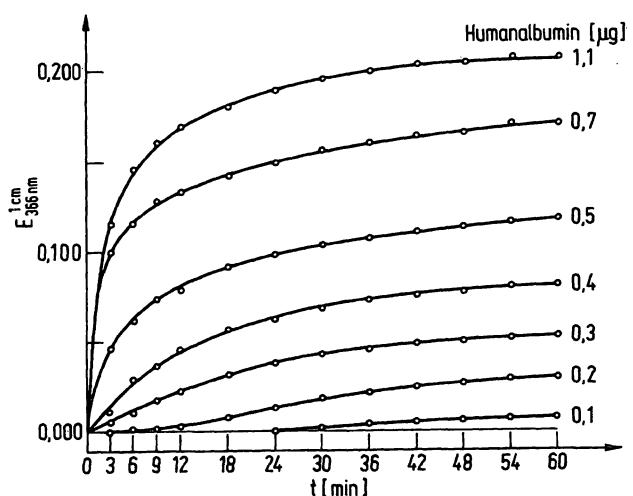


Abb. 1. Nephelometrische Messung von Human-Albumin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Im Ansatz (Gesamt volumen 320 µl) waren: 250 µl 0,1 mol/l Triäthanolaminpuffer pH 7,4 in 0,14 mol/l NaCl, 50 µl Antiserum, 20 µl Probe; $d = 1$ cm, 366 nm. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

zwischen 0,2 und 0,8 μg Albumin bei einem Variationskoeffizienten VK zwischen 18 und 4%.

Saures α_1 -Glycoprotein (Gesamt volumen 300 μl):

200 μl 0,1 mol/l Triäthanolamin-Puffer pH 7,4 in 0,14 mol/l NaCl
 50 μl Antiserum vom Kaninchen¹) unverdünnt
 50 μl Probe

Eine ausreichende, konstante Trübung wird erst nach 150 min Inkubation gemessen (Abb. 2). Die Eichkurve verläuft zwischen 0,5 und 1,0 μg saures α_1 -Glycoprotein linear bei einem VK zwischen 8 und 4%.

Gesamt-Immunglobulin IgG, A, M (Gesamt volumen 320 μl):

250 μl 0,1 mol/l Triäthanolamin-Puffer pH 7,4 in 0,14 mol/l NaCl
 50 μl Antiserum von Ziege¹) unverdünnt
 20 μl Probe

Eine maximale Trübung wird erst nach 180 min Inkubation und länger erhalten (Abb. 3). Die Eichkurve verläuft zwischen 2 und 4 μg Gesamt-Immunglobulin linear bei einem VK zwischen 7 und 3% (Abb. 4).

Immunglobulin IgG (Gesamt volumen 320 μl):

250 μl 0,1 mol/l Triäthanolamin-Puffer pH 7,4 in 0,14 mol/l NaCl
 50 μl Antiserum von Kaninchen¹) unverdünnt
 20 μl Probe

Die maximale Ausbildung der Trübung wird bei niederen Konzentrationen nach 90 min, bei höheren bereits früher entwickelt (Abb. 5). Die Eichkurve verläuft zwischen 0 und 2 μg Gesamtglobulin linear bei einem VK zwischen 10 und 1% (Abb. 6).

Sämtliche Reaktionen werden mit der Probe gestartet. Als Leerwert dient der jeweilige Ansatz ohne Probe, jedoch mit gleichem Volumen 0,1 mol/l Triäthanolamin-Puffer in 0,14 mol/l NaCl. Zur Aufstellung von Eichkurven dient standardisiertes Humanserum¹). Die zu messenden Proben werden nach Ermittlung des Gesamtproteingehaltes (s. o.) mit 0,15 mol/l NaCl auf Konzentrationen des linearen Teils obiger Eichkurven verdünnt.

Statistische Berechnungen

Standardabweichung und Variationskoeffizient VK % werden nach Büttner et al. (49) berechnet.

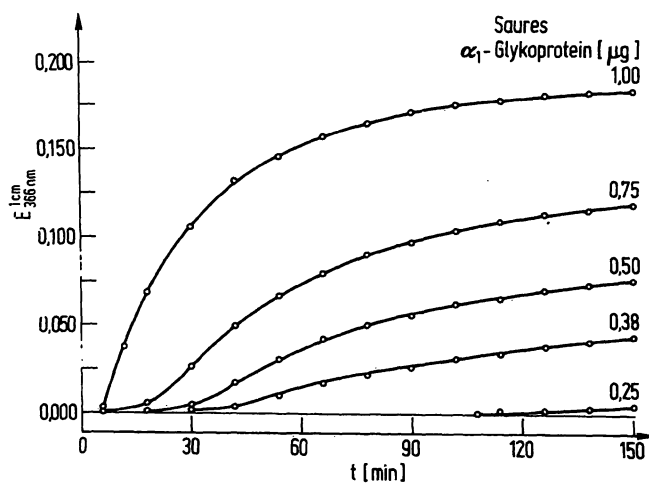


Abb. 2. Nephelometrische Messung von saurem α_1 -Glycoprotein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
 Im Ansatz (Gesamt volumen 300 μl) waren: 200 μl 0,1 mol/l Triäthanolaminpuffer pH 7,4 in 0,14 mol/l NaCl, 50 μl Antiserum, 50 μl Probe; $d = 1$ cm, 366 nm. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

¹) Bezogen von Behring-Werken, Marburg/L.

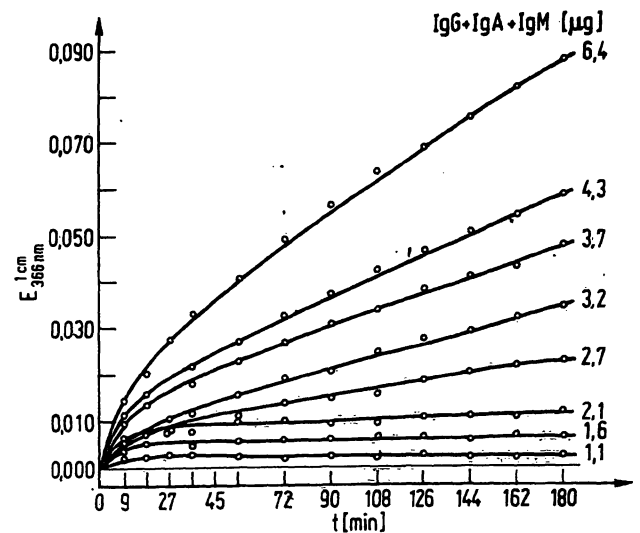


Abb. 3. Nephelometrische Messung von Gesamtimmunglobulinen IgG, A, M in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Im Ansatz (Gesamt volumen 320 μl) waren: 250 μl 0,1 mol/l Triäthanolaminpuffer pH 7,4 in 0,14 mol/l NaCl, 50 μl Antiserum, 20 μl Probe; $d = 1$ cm, 366 nm. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

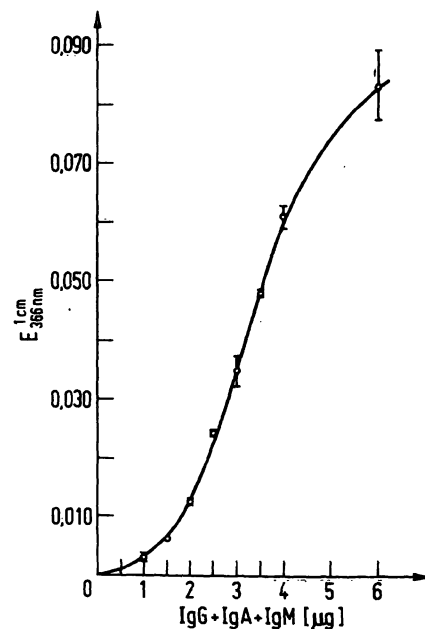


Abb. 4. Eichkurve zur nephelometrischen Messung von Gesamtimmunglobulinen IgG, A, M.
 Einzelheiten s. Legende zu Abbildung 3 und Methodik.

Ergebnisse

Nach Entfernung der Zellen mittels Membranfiltration (Ausbeute 96% Gesamtprotein) wird nach Vakuum-Ultrafiltration eine bessere Gesamtproteinausbeute erhalten (96%) als nach Gefriertrocknung (88%, Mittelwert von 2 Versuchen, vgl. Schema 1). Bei der Entfernung der Zellen läßt sich kein Verlust an Proteinen (saures α_1 -Glycoprotein, Albumin, Gesamtimmunglobuline, IgG, IgA, IgM) mittels umgekehrter einfacher radialer und einfacher radialer Immundiffusion feststellen: Die Ausbeuten dieser Proteine liegen zwischen

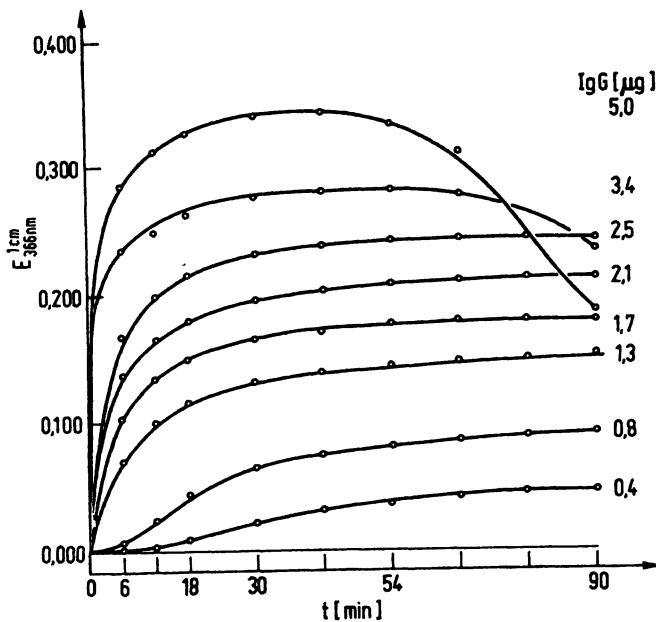


Abb. 5. Nephelometrische Messung von Immunglobulin IgG in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
Im Ansatz (Gesamtvolumen 320 µl) waren: 250 µl 0,1 mol/l Triäthanolaminpuffer pH 7,4 in 0,14 mol/l NaCl, 50 µl Antiserum, 20 µl Probe; d = 1 cm, 366 nm. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

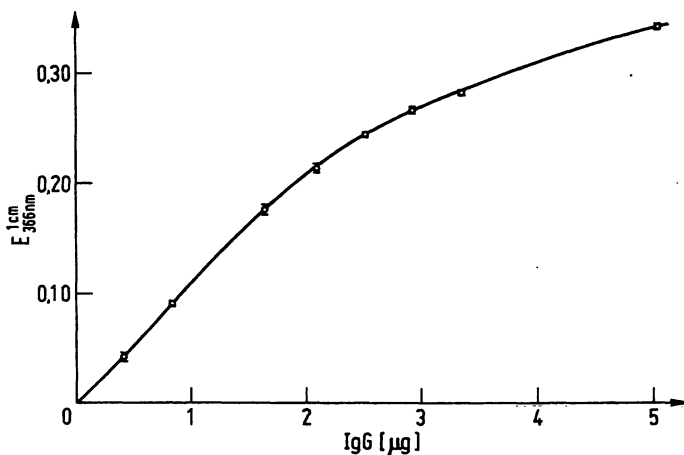


Abb. 6. Eichkurve zur nephelometrischen Messung von Immunglobulin IgG.
Einzelheiten s. Legende zu Abbildung 5 und Methodik.

97 und 100%. Vergleichbare, jedoch für saures α_1 -Glycoprotein (Ausbeute 89%) und Albumin (Ausbeute 91%) etwas niedrigere Werte werden mit der *nephelometrischen Antigen-Antikörpermessung* ermittelt. Im mittels *Vakuum-Ultrafiltration* erhaltenen Konzentrat lassen sich bei einer guten Ausbeute an Gesamtprotein (96%) ebenso gute Ausbeuten an saurem α_1 -Glycoprotein (98%) und Albumin (90%) mit Hilfe von *Immuno-diffusions-Methoden* feststellen, jedoch schlechte Ausbeuten für die gesamten Immunglobuline (Σ IgG, A, M: 72%), die besonders auf Kosten von IgM (47%) weniger von IgA (81%) gehen, nicht jedoch von IgG (98%) (Tab. 1).

Liquor cerebrospinalis
350 ml \approx 103 mg Gesamtprotein \approx 100%

Entfernung der Zellen
durch Membranfiltration
(25° C, Porengröße 0,6 µm)

Liquor-Filtrat
(96 \pm 1%)

Konzentrierung durch

Vakuum-Ultrafiltration
in Kollodium-Hülsen
bei 4° C (96 \pm 3%)

Gefriertrocknung
bei 25° C (88 \pm 4%)

Schema 1. Schema für die Konzentrierung von Liquor cerebrospinalis.
Werte in Klammern: Ausbeute an Gesamtprotein in %, Mittelwerte von 2 Versuchen. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

Tab. 1. Anreicherung von Proteinen im menschlichen Liquor cerebrospinalis mittels zweier verschiedener Methoden.
Proteinmessungen mittels umgekehrter einfacher radialer Immundiffusion (saures α_1 -Glycoprotein und Σ IgG, A, M) und einfacher radialer Immundiffusion (Albumin, IgG, IgA, IgM). Mittelwerte zweier Versuche mit Standardabweichung. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

| Komponente (mg) | Vor Konzentrierung | Nach Konzentrierung durch | |
|--|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| | | Vakuum- Ultrafiltration | Gefrier- trocknung |
| Saures α_1 -Glycoprotein | 1,19 \pm 0,47 | 1,16 \pm 0,03 | 1,06 \pm 0,11 |
| Ausbeute | 100% | 98% | 89% |
| Albumin | 57,8 \pm 0,8 | 52,1 \pm 1,0 | 45,1 \pm 1,2 |
| Ausbeute | 100% | 90% | 78% |
| Immunglobulin (Σ IgG, A, M) | 26,4 \pm 6,1 | 18,9 \pm 0,5 | 16,1 \pm 0,5 |
| Ausbeute | 100% | 72% | 61% |
| Immunglobulin IgG | 6,1 \pm 0,2 | 6,0 \pm 0,3 | 5,2 \pm 1,1 |
| Ausbeute | 100% | 98% | 85% |
| Immunglobulin IgA | 3,1 \pm 0,3 | 2,5 \pm 0,1 | 2,3 \pm 0,1 |
| Ausbeute | 100% | 81% | 74% |
| Immunglobulin IgM | 14,4 \pm 0,4 | 6,8 \pm 0,2 | 5,6 \pm 0,1 |
| Ausbeute | 100% | 47% | 39% |
| Σ IgG, A, M | | | |
| Albumin | 0,46 | 0,36 | 0,36 |
| Saures α_1 -Glycoprotein | 0,021 | 0,022 | 0,024 |
| Albumin | | | |

Präalbumin läßt sich mit umgekehrter einfacher radialer Immundiffusion nicht quantitativ messen. *Nephelometrische Messungen* (Tab. 2) ergeben bedeutend schlechtere Ausbeuten für saures α_1 -Glycoprotein (58%) und für die Gesamtimoglobuline (44%), was wiederum nicht auf Kosten von IgG geht (IgG-Ausbeute 78%). Ähnliche Aussagen gibt der Quotient der Konzentrationen aus Σ IgG, A, M/Albumin (Tab. 1 u. 2). Diese Befunde lassen sich nicht durch eine Membrandurchlässigkeit für diese Proteinmoleküle erklären, da im Filtrat kein Protein nachgewiesen werden konnte.

Bei der *Gefriertrocknung* des Sammelliquors werden bei einer Gesamtproteinausbeute von 88% z. T. weit geringere Ausbeuten einzelner Proteine erhalten: Mittels *Immundiffusion* läßt sich ein stärkerer Verlust an Gesamtimoglobulinen feststellen (39%), der besonders stark auf Kosten von IgM (61% Verlust) geht, neben IgA (26%) und IgG (15% Verlust, s. Tab. 1). Aber auch die Ausbeuten an Albumin und saurem α_1 -Glycoprotein (78% und 89%) sind geringer als diejenigen im mittels Vakuum-Ultrafiltration erhaltenen Liquorkonzentrat (Tab. 1). Mittels *nephelometrischer Antigen-Antikörpermessung* werden noch geringere Ausbeuten dieser Proteine ermittelt als mittels Immundiffusions-Techniken (Tab. 2): Am stärksten ist die Ausbeute von saurem α_1 -Glycoprotein vermindert, — sie erreicht Werte von 12% —, dann folgen die Ausbeuten an Gesamtimoglobulinen (33%), IgG (66%) und Albumin (73%).

Tab. 2. Anreicherung von Proteinen im menschlichen Liquor cerebrospinalis mittels zweier verschiedener Methoden. Nephelometrische Messungen von Proteinen mittels ihres Antigen-Antikörperkomplexes. Mittelwert zweier Versuche mit Standardabweichung. Weitere Einzelheiten s. Methodik.

| Komponente (mg) | Vor Konzentrierung | Nach Konzentrierung durch Vakuum-Ultrafiltration | Gefriertrocknung |
|---|--------------------|--|------------------|
| Saures α_1 -Glycoprotein | 1,75 \pm 0,10 | 1,02 \pm 0,09 | 0,21 \pm 0,04 |
| Ausbeute | 100% | 58% | 12% |
| Albumin | 55,7 \pm 2,4 | 50,3 \pm 0,9 | 40,7 \pm 1,1 |
| Ausbeute | 100% | 90% | 73% |
| Immunglobulin (Σ IgG, A, M) | 20,0 \pm 2,4 | 8,8 \pm 0,4 | 6,6 \pm 1,1 |
| Ausbeute | 100% | 44% | 33% |
| Immunglobulin IgG | 8,6 \pm 2,2 | 6,7 \pm 0,1 | 5,7 \pm 0,1 |
| Ausbeute | 100% | 78% | 66% |
| Σ IgG, A, M / Albumin | 0,36 | 0,17 | 0,16 |
| Saures α_1 -Glycoprotein / Albumin | 0,031 | 0,020 | 0,005 |

Das Verhältnis der Konzentrationen Σ IgG, A, M/Albumin, gemessen mittels Diffusions- und nephelometrischer Antigen-Antikörper-Meßtechniken, zeigt, daß diese Komponenten während der Konzentrierung durch Vakuum-Ultrafiltration und Gefriertrocknung qualitativ gleichartig abnehmen (Tab. 1 und 2). Dagegen verhält sich der Quotient saures α_1 -Glycoprotein/Albumin bei beiden Methoden unterschiedlich.

Diese Befunde indizieren Veränderungen an Proteinen, die während der Konzentrierung von Sammelliquor auftreten.

Diskussion

Die Prüfung der Zusammensetzung und Ausbeute von Proteinen bei verschiedenartigen Konzentrierungsverfahren wurde bis jetzt fast ausschließlich mit unverdünntem Humanserum durchgeführt, wobei Gesamtprotein (22) und relative Zusammensetzung einzelner Proteinfaktionen mittels Papier- (4, 8, 26, 27, 29, 38, 43) und Acetatfolienelektrophorese (5, 9–11, 16, 22) vor und nach Konzentrierung ermittelt wurden. Bei den verschiedenen Verfahren wurden geringe relative Veränderungen in der α_1 - und α_2 -Globulinfraktion (5, 8, 9, 22, 26, 27, 29, 38) sowie der β_1 - und β_2 -Globulin- (5, 9, 10, 22, 27, 29, 50, 51) und γ -Globulinfraktion (5, 9, 11, 22, 29, 38, 52) festgestellt, die sich auf Denaturierungsvorgänge bei der Einengung zurückführen lassen (vgl. 14, 40, 53, 54): z. B. Herauslösen von Lipiden mittels Aceton, Strukturveränderungen infolge Überdruck, Ausfällung durch erniedrigte Salzkonzentrationen und pH-Verschiebungen in Richtung des isoelektrischen Punktes, Einwirkung von zweiwertigen Metallionen (55) sowie Bildung von Aggregaten bestimmter Proteinmoleküle (vgl. 56).

Bei länger dauernden Konzentrierungsverfahren dürften enzymatische Abbauvorgänge auftreten. So läßt sich z. B. aus Transferrin, das in der Elektrophorese in der β_1 -Fraktion wandert, nach Abspaltung von Neuraminsäure mittels Neuraminidase ein in der β_2 (γ)-Fraktion wanderndes Protein herstellen (vgl. 50, 57, 58). Entsprechende Enzymaktivitäten ließen sich im Liquor cerebrospinalis bis jetzt jedoch nicht nachweisen (vgl. 59).

Trotzdem stellten *Kaplan* und *Johnstone* (5) bei vergleichenden Untersuchungen verschiedener Einengungsverfahren die Vakuum-Ultrafiltration durch Kollodiumhüllen als die am besten geeignete Konzentrierungsmethode für elektrophoretische Untersuchungen der Liquorproteine heraus. Aber auch zur Anreicherung von Enzymproteinen im Liquor cerebrospinalis scheiden sowohl Vakuum-Ultrafiltration als auch Druckfiltration durch eiweißdichte Filter aus, da Denaturierungen derselben auftreten (60).

In der vorliegenden Arbeit werden mittels spezifischer immunologischer Nachweise einzelne Proteine quantitativ gemessen vor und nach der Konzentrierung von

Sammelliquor mit Hilfe zweier verschiedenartiger Verfahren. Im Gegensatz zum Elektrophoreseprüfverfahren (s. o.), das den relativen Anteil am Gesamtprotein einzelner Proteinfractionen angibt, welche aus mehreren immunologisch nachweisbaren spezifischen Proteinen bestehen (50, 61, 63), werden mit den hier verwendeten spezifisch-quantitativen Bestimmungsmethoden deutliche, z. T. starke Verluste bestimmter Proteine (saures α_1 -Glycoprotein, Immunglobuline IgG, A, M) bei beiden untersuchten Konzentrierungsverfahren nachgewiesen. Diese Verluste sind bei der Konzentrierung von Sammelliquor stärker ausgeprägt als bei verdünntem Humanserum (vgl. 44) und lassen sich am wenigsten auf die Passage durch Poren semipermeabler Membranen bei der Vakuum-Ultrafiltration zurückführen bzw. auf Oberflächenadsorption (vgl. 34, 64–66). Niedermolekulare und damit permeable Unterheiten der Immunglobuline können auch nicht

diese Verluste erklären. Vielmehr dürften bei beiden Konzentrierungsverfahren auftretende Denaturierungsvorgänge besonders bei Immunglobulinen eine wesentliche Rolle spielen (z. B. Bildung von Aggregaten, vgl. 56), was sich mit nephelometrischen Antigen-Antikörper-Messungen offenbar besonders gut darstellen läßt.

Zusammenfassend muß festgestellt werden, daß sich mittels immunologisch-quantitativer Bestimmungsmethoden bei der Konzentrierung von Liquorproteinen mittels Vakuum-Ultrafiltration bzw. Gefrier-trocknung Ausbeuteverminderungen von Proteinen nachweisen lassen, die sich entgegen früheren Angaben (4, 8, 31, 38, 64) nicht gleichmäßig auf alle Proteine des Liquors beziehen. Damit dürfte es bei der Elektrophorese von mit obigen Methoden konzentrierten Liquorproteinen zu nicht korrigierbaren Fehlinterpretationen kommen.

Literaturverzeichnis

- Albert-Recht, F. (1959), *Clin. Chim. Acta* 4, 627–638.
- Oriol-Bosch, A. & Voigt, K. D. (1959), *Klin. Wochenschr.* 37, 758–761.
- Kaplan, A. & Savory, J. (1965), *Clin. Chem.* 11, 937–942.
- Mies, H. J. (1953), *Klin. Wochenschr.* 31, 159–161.
- Kaplan, A. & Johnstone, M. (1966), *Clin. Chem.* 12, 717–727.
- Schönenberg, H. (1954), *Ann. Paediatr. (Basel)* 183, 309–320.
- Wesselmann, E. & Ewerbeck, H. (1954), *Monatsschr. Kinderheilk.* 102, 188–191.
- Ewerbeck, H. (1950), *Klin. Wochenschr.* 28, 692–693.
- Igou, P. C. (1967), *Amer. J. Med. Techn.* 33, 501–504.
- Windisch, R. M. & Bracken, M. M. (1970), *Clin. Chem.* 16, 416–419.
- Fischer-Williams, M. & Roberts, R. C. (1971), *Arch. Neurol.* 25, 526–534.
- Clausen, J. (1962), *Danish Med. Bull.* 9, 1.
- Siemes, H. (1972), *Monatsschr. Kinderheilk.* 120, 262–264.
- Kaplan, A. (1967), *J. Med. Sci.* 253, 549–555.
- Schmidt, R. M. (1955), *Psychiat. Neur. Med. Psychol.* 7, 174–176.
- Cosgrove, J. B. R. & Agius, P. (1965), *Neurology* 15, 1155–1160.
- Fisk, A. A., Chanutin, A. & Klingman, W. O. (1951), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78, 1–3.
- Whitacker, J. N. & Lemmi, H. (1966), *Amer. J. Clin. Pathol.* 45, 643–646.
- Delank, H. W. (1956) *Deut. Z. Nervenheilk.* 174, 429–442.
- Oldershausen, v. H. F., Aly, F. W. & Gries, G. (1953), *Klin. Wochenschr.* 31, 649–654.
- Pruckner, F. & Schwuttke, G. (1955), *Arch. Psychiat. Nervenkrankh.* 193, 48–50.
- Esser, H. & Heinzler, F. (1952), *Klin. Wochenschr.* 30, 600–601.
- Riechert, W. & Weber, W. (1957), *Ärzt. Forsch.* 11, 512–514.
- Maier, K. H. & Voggel, K. (1963), *Klin. Wochenschr.* 41, 286–290.
- Werner, M. (1969), *J. Lab. Clin. Med.* 74, 166–173.
- Schroer, H. & Imhof, E. (1957), *Klin. Wochenschr.* 35, 890–891.
- Gries, G., Aly, F. W. & Oldershausen, H. F. v. (1953), *Klin. Wochenschr.* 31, 644–649.
- Whitacker, J. N. & Lemmi, H. (1966), *Techn. Bull. Reg. Med. Techn.* 36, 91–94.
- Rossi, G. & Schneider, G. (1953), *Klin. Wochenschr.* 31, 969–975.
- Schneider, G. & Wallenius, G. (1951), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 3, 145–150.
- Plückthun, H. & Matthes, A. (1953), *Z. Kinderheilk.* 72, 521–531.
- Goa, J. & Tveten, L. (1963), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15, 152–158.
- Burrows, S. (1965), *Clin. Chem.* 11, 1068–1069.
- Felgenhauer, K., Engel, H., Rapic, N. & Schliep, G. (1973), *diese Z.* 11, 173–174.
- Kutt, H., McDowell, F., Chapman, L., Pert, J. H. & Hurwitz, L. J. (1960), *Neurology* 10, 1064–1067.
- Steger, J. (1953), *Deut. Z. Nervenheilk.* 170, 106–121, 171, 1–19.
- Field, H. (1954), *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 17, 228–232.
- Bücher, T., Matzelt, D. & Pette, D. (1952), *Klin. Wochenschr.* 30, 325–330.
- Bauer, H. (1953), *Deut. Z. Nervenheilk.* 170, 381–401.
- Lowenthal, A. (1964), *Agar gel electrophoresis in neurology*, Verlag Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- Pieper, J. (1954), *Klin. Wochenschr.* 32, 597–600.
- Lafon, R., Monnier, P., Minvielle, J. & Baldy, S. (1955), *Montpellier Med.* 47, 585–588.
- Knapp, A. & Sieler, H. (1953), *Z. Gesamte Inn. Med. Ihre Grenzgebiete* 8, 741–749.
- Kleine, T. O., Stroh, M. & Stroh, J. (1972), VIII. World Congress of Anatomic and Clinical Pathology, Munich, Verlag Excerpta Medica, Congress Series No. 262, S. 65–66.
- a. Richterich, R. (1968), *Klinische Chemie – Theorie und Praxis*, 2. Aufl. S. 246, Akadem. Verlagsgesellschaft Frankfurt/M.
- Groc, W. (1970), *Ärzt. Lab.* 16, 15–23.
- Mancini, G., Carbonara, A. O. & Heremans, J. F. (1965), *Immunochemistry* 2, 235–254.
- Becker, W., Rapp, W., Schwick, H. G. & Störko, K. (1968), *diese Z.* 6, 113–122.
- Kleine, T. O. (1968), *diese Z.* 6, 18–24.
- Büttner, H., Hansert, E. & Stamm, D. (1970), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 2. Aufl., Bd. 1, 282–364, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
- Laurell, C. B. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, suppl. 124, 71–82.

51. Hoch, H. & Chanutin, A. (1952), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **81**, 628–633.
52. Franx, J. (1952), *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* **13**, 92–94.
53. Moore, D. H., Roberts, J. B., Costello, M. & Schonberger, T. W. (1949), *J. Biol. Chem.* **180**, 1147–1158.
54. Putman, F. W. (1960), *The Plasma Proteins* (Vol. I) 245 ff, Academic Press, New York.
55. Laurell, C. B., Laurell, S. & Skoog, N. (1956), *Clin. Chem.* **2**, 99–111.
56. Kleine, T. O. (1969), *diese Z.* **7**, 313–324.
57. Pette, D. & Stupp, I. (1960), *Klin. Wochenschr.* **38**, 109–110.
58. Parker, W. C. & Bearn, A. G. (1962), *J. Exp. Med.* **115**, 83–105.
59. Parker, W. C., Hagstrom, J. W. C. & Bearn, A. G. (1963), *J. Exp. Med.* **118**, 975–989.
60. Heitmann, R. & Stammeler, A. (1966), *Klin. Wochenschr.* **44**, 273–276.
61. Scheiffarth, F., Götz, H., Berg, G. & Hopfensperger, H. (1958), *Klin. Wochenschr.* **36**, 678–681.
62. Gavrilasco, K., Courcon, J., Hillion, P., Uriel, J., Léwin, L. & Grabar, P. (1955), *Nature (London)* **19**, 976.
63. Frick, E. (1962), *Klin. Wochenschr.* **40**, 152–158.
64. Mumenthaler, M. & Märki, H. (1957), *Klin. Wochenschr.* **35**, 1–7.
65. McGarry, E., Sehon, A. H. & Rose, B. (1953), *J. Clin. Invest.* **34**, 832–844.
66. Frantzen, E., Frantzen, A., Jensen, R. & Fog, T. (1954), *Danish Med. Bull.* **1**, 49–55.

Prof. Dr. T. O. Kleine
D-355 Marburg/L.
Ortenbergstraße 8